蚊幼虫感染苏云金杆菌以色列变种后病理的研究*

吴 秋 雁
（中山大学昆虫学研究所）

摘要 本文用电子显微镜、蛋白质凝胶电泳和蛋白水解酶测定的方法，比较研究了三种蚊幼虫在感染苏云金杆菌以色列变种后中肠组织的病变，经苏云金杆菌以色列变种处理10分钟后，中肠细胞的细胞器即呈现病变，最明显的是线粒体呈现极度的电子致密状态，细胞质的粗糙内质网也开始瓦解，处理16小时后，细胞核膨胀，各种细胞器进一步瓦解，而围食膜仍然完好。此时细胞的盐溶性蛋白含量减少，图谱上明显缺少一条蛋白区带。另方面，感染10分钟后，中肠的蛋白水解酶活性便下降，不同蚊种的酶活性相差比较大，幼虫中肠的蛋白水解酶主要为胰蛋白酶。

根据结果分析，我们初步认为，苏云金杆菌以色列变种，对蚊幼虫的毒效是苏云金杆菌以色列变种的毒素对中肠细胞能量代谢和中肠蛋白酶活性产生抑制的结果。

关键词 苏云金杆菌以色列变种 蚊幼虫 病理变化

苏云金杆菌以色列变种 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 是 Goldberg (1977) 从以色列的蚊幼虫孳生水塘的泥土中分离出来的一种对蚊幼虫毒性很高的杆状细菌。1979年我国从美国引进该菌种，经我们的研究证明，该菌种确实对多种蚊幼虫有高的毒杀力，它专一性强，是目前一种较好的微生物灭蚊剂。为更有效地发挥其防治效果提供依据，我们进行了苏云金杆菌以色列变种对蚊幼虫致病作用的研究。

材 料 与 方 法

试验蚊种有白纹伊蚊 *Aedes albopitus* Skuse 骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus*(Coquillett) 和致乏库蚊 *Culex fatigans* Wiedmann 三种，幼虫在室温 22—28℃ 用蒸馏水饲养，喂饲由 95% 面粉，3% 酵母粉和 2% 猪肝粉混合的饲料。

苏云金杆菌以色列变种（简称 *B. t. i*）的处理试验是称取菌粉(42—97 亿孢子/克)配制成 1ppm 浓度的菌液，每 400 毫升菌液放入蚊幼虫 30—50 头，置于 26—28℃ 恒温箱，经不同时间取出幼虫进行试验：(1) 电镜的观察——解剖蚊 4 龄期幼虫的中肠组织，用 2.5% 戊二醛固定 3 小时，用 1% 锇酸作后固定 1 小时，组织经系列乙醇脱水，在脱水过程中用 0.5% 醋酸铀块染，之后用 PDAP（苯二甲酸二丙烯酯和苯二甲酸二壬酯）包埋，用 LKB 8800 型切片机作超薄切片，再以柠檬酸铅复染，最后在日立 HU-12A 电镜观察；(2) 蛋白质的电泳——每一样品约含 200—300 头 4 龄期幼虫的中肠组织(去除围食膜及内含物)，加入 0.5 毫升磷酸缓冲液 (pH 7.0) 匀浆，置于 4℃ 冰箱中抽提过夜，次

本文于 1984 年 3 月收到。
* 中国科学院科学基金资助课题。文稿承蒲蛰龙、利翠英教授审阅，胡奕传同志帮助绘图及洗印照片，一并致谢。

日匀浆在 4℃ 以 4,000 转/分离心 30 分钟，抽提液在 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶中进行垂直圆盘电泳，每管样品 50—100 微升，电泳在三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (pH 8.3) 和在 150—400V 电压下进行约 1.5 小时。电泳后以 1% 考马斯亮蓝或按糖蛋白染色法染色，记录蛋白区带迁距，电泳图谱以波长 550nm 扫描；(3) 蛋白酶活性的测定——按不同天数解剖蚊 4 龄期幼虫的中肠(包括围食膜内含物)，每样品为 1 头幼虫中肠，全部放置 −18℃ 冰冻保存待测，试验时用 1.5 × 15 厘米的试管，每管盛 10 毫克蛋白酶的底物——天青皮粉 (Hide powder azure)，加入 4.5 毫升磷酸缓冲液 (pH7.8)，每头幼虫的中肠以 0.5 毫升同样的缓冲液匀浆，然后将其倾入上述已放有底物的试管中，在 37℃ 水浴中保温半小时，每隔 5 分钟搅拌一次，保温结束立即将试管移入冰水以终止反应。对照空白管在保温之后才加匀浆。各管样品经过滤后，在 721 型分光光度计，以波长 595nm 测定，记录光密度值。胰酶抑制试验所用胰酶抑制剂为大豆胰酶抑制剂。

结 果

(一) 中肠上皮细胞细胞器的形态变化

三种蚊幼虫中肠上皮细胞的正常线粒体因不同的生理状态而有不同的形态，有的呈电子透明状，有的呈电子致密状，大小也不一样，但它们的外膜与内嵴基本完整 (图版 I: 1)。细胞内正常的粗糙内质网排列整齐，核糖体附着在膜上，清晰可见(图版 I: 2)。蚊幼虫取食 *B. t. i* 菌液后 10 分钟，便可发现上皮细胞内的细胞器呈现病变的现象，最明显的是线粒体出现电子极度致密状态，靠近细胞基部的线粒体尤为显著，有些线粒体内嵴破坏，有些线粒体外膜破裂，基质外溢(图版 I: 3)。同时还可以观察到细胞质的粗糙内质网膜和核糖体模糊不清，部分核糖体开始脱落(图版 I: 4)。幼虫取食 *B. t. i.* 菌液 16 小时后，中肠上皮细胞的微绒毛出现萎缩，微绒毛旁的线粒体严重破坏 (图版 II: 5)，粗糙内质网膜断裂，核糖体游离(图版 II: 6)。另外，还可看到细胞核膨胀，染色质远离核膜(图版 II: 7)。此时，其他细胞器也进一步瓦解，细胞质中出现大的空间，然而，围食膜却仍然完好(图版 II: 8)。

(二) 中肠肠壁细胞蛋白质电泳图谱的变化

骚扰阿蚊正常 4 龄期幼虫中肠肠壁细胞的盐溶性蛋白质，电泳结果显示十多条蛋白质区带，其中三条区带为糖蛋白性质，它们的含量较多，分子量较小，泳动较快。幼虫取食 *B. t. i.* 菌液 1 小时内，肠壁细胞的蛋白质电泳图谱变化不大。当幼虫取食 *B. t. i.* 菌液 16 小时后，肠壁细胞的蛋白质电泳图谱才出现较明显的变化，主要是其中一条区带缺如，其余区带含量也有些减少，而三条糖蛋白带基本上没有变化 (图 1)。

(三) 中肠蛋白酶活性的变化

骚扰阿蚊和致乏库蚊 4 龄期幼虫的中肠匀浆物都有显著的蛋白酶活性，骚扰阿蚊 4 龄期幼虫，蛋白酶的活性在第 3 天时有一高峰，致乏库蚊整个 4 龄期，蛋白酶的活性比较平稳，骚扰阿蚊 4 龄期幼虫的最高酶活性为致乏库蚊的 8 倍 (图 2)。经取食 *B. t. i.* 菌液后，两种蚊幼虫的蛋白酶活性均受到影响，而且时间愈长影响愈大，其中又以取食量较大的骚扰阿蚊受到的影响为显著 (图 3)。胰酶抑制剂的试验结果表明，80% 以上的蛋白酶活性被抑制，说明这两种蚊幼虫中肠的蛋白酶主要是胰蛋白酶 (图 4)。

A

B

图 1　骚扰阿蚊 4 龄期幼虫中肠肠壁细胞盐溶性蛋白质的电泳扫描图谱
A 为正常，B 为处理。

相对活性（O. D. 595 nm）
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0
1 2 3 4 5 （天）
骚扰阿蚊幼虫

0.100
0.050
0
1 2 3 （天）
致乏库蚊幼虫

图 2　正常骚扰阿蚊和致乏库蚊 4 龄期幼虫中肠蛋白酶的不同活性比较。

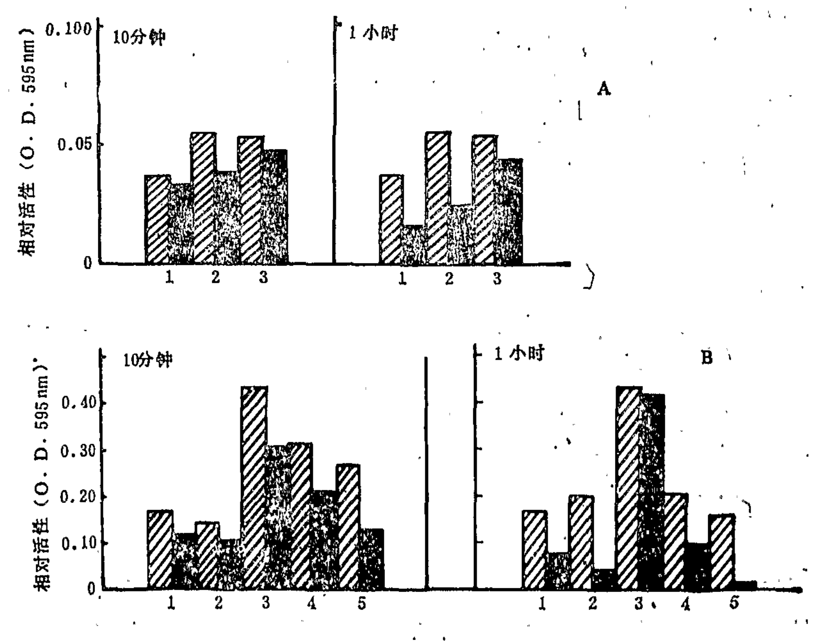


图 3　*B. t. i.* 对致乏库蚊和骚扰阿蚊 4 龄历期中肠蛋白酶活性的影响
A. 库蚊　B. 阿蚊　▨ 正常　■ 处理

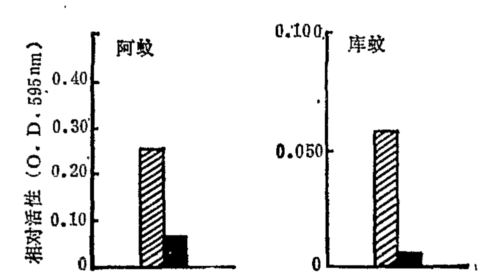


图 4 胰酶抑制剂对致乏库蚊和骚扰阿蚊幼虫中肠蛋白酶的抑制作用

正常 加抑制剂

讨 论

关于 *B. t. i* 对蚊幼虫的作用机理方面，目前国内外研究的文献资料不多，我们只看到 Barjac（1978c）对埃及伊蚊幼虫病变的组织学观察。看来 *B. t. i.* 对蚊幼虫的作用方式和其他苏云金杆菌对某些鳞翅目幼虫的作用类似。

苏云金杆菌对鳞翅目幼虫的作用方式可分为两种类型，一种是幼虫取食杆菌几小时后，中肠便失去正常功能，肠道环肌全部松弛，上皮细胞自基膜脱离，碱性肠液渗入到血淋巴内，引起血淋巴的 pH 增高，从而导致幼虫瘫痪死亡，这种情况为 I 型。另一种情况是幼虫取食杆菌后，菌体自肠道进入组织，它们在中肠繁殖很快，并从肌肉细胞间隙穿入体腔，脂肪体遭到破坏，当体腔中充满细菌后，幼虫便"软化"死亡，此为 II 型，整个过程需要 2—4 天，比 I 型的作用慢。大多数鳞翅目种类的幼虫属于 II 型，而蚊幼虫取食 *B. t. i.* 后中毒很快，处理 20 分钟后便陆续出现死亡，24 小时后死亡率达 90% 以上，我们经尸解观察，在体腔内没有发现菌体，中肠组织和脂肪体组织却完全瓦解，但围食膜完整，因此看来属于 I 型。

虽然苏云金杆菌内毒素的作用方式目前还不十分清楚，Cooksey 等(1969)曾提出，内毒素使鳞翅目幼虫中肠溃烂的原因是由于内毒素扰乱了中肠细胞膜的离子传导功能。Lüthy（1973）则认为是由于上皮细胞的自动坏死。Paul（1974）却指出，鳞翅目幼虫在取食杆菌后 1—2 分钟内，在血淋巴中便发现有 H^3-亮氨酸的内毒素蛋白碎片。Fast 等(1971）发现，家蚕幼虫在取食杆菌后 1 分钟，葡萄糖便大量入注中肠上皮细胞，10 分钟后又停止入注，这种在肠道组织破坏之前出现的葡萄糖入注，说明以上所观察到的生理和组织变化只是次效应，Travers 等(1976)用检压法和比色法测定了苏云金杆菌 δ-内毒素对家蚕中肠细胞离体线粒体的效应进一步表明，毒肽对线粒体有刺激氧吸收和抑制 ATP 产生的作用，他认为毒肽和氧化磷酸化的解偶联剂的作用相似，当毒素使氧的吸收增加而 ATP 的产量下降时，在这不能保持电子传递的系统中便产生高的还原势，这时葡萄糖异化过程的需要，促使中肠细胞大量吸收葡萄糖，而由于氧化磷酸化的解偶联，又引起需要 ATP 作为能源的中肠细胞停止吸收葡萄糖，此时，细胞的能量水平迅速下降，细胞的渗透压调节随即失去控制，血淋巴中 K^+ 和其他离子的浓度增高，终使细胞膨胀并完全瓦解。

我们从电镜观察到蚊幼虫取食 *B. t. i.* 菌液后 10 分钟，中肠上皮细胞内线粒体便出现形态异常，推测其作用方式可能与上述类似，一般的氧化磷酸化解偶联剂如二溴苯酚和

二香豆醇，能与线粒体某些蛋白质牢固结合，从而破坏氧化磷酸化功能。Fast（1970）曾证实，提取的苏云金杆菌 δ-内毒素与细胞色素C结合，导致氧化型底物的还原。Hackenbrack（1966）的报告指出，代谢稳定期，线粒体功能的变化伴随超微结构的可逆改变，当将 ADP 加入到缺乏磷酸受体系统（即当 4 期向 3 期过渡）的线粒体时，线粒体的形态即出现改变，4 期的线粒体为平时所见的"一般"形状，转入 3 期的线粒体其基质的电子密度增加为"致密"状，致密状的线粒体是处于低能量时期的线粒体，表明在紧密偶联的线粒体中，其代谢活动是连系着形态变化的。结合我们所观察到的结果，可以推测，蚊幼虫取食 *B. t. i.* 菌液后，晶体经碱性肠液作用分解出毒肽，小分子量的毒肽穿过围食膜被上皮细胞吸收，与线粒内嵴呼吸链上的某些成分紧密结合，从而破坏呼吸链氧化磷酸化的正常功能，由于细胞的能量代谢受到抑制，随即影响到整个细胞的基础代谢，特别是细胞质粗糙内质网的瓦解，从我们的蛋白质电泳结果可以看出，*B. t. i.* 处理 16 小时，幼虫中肠肠壁细胞的蛋白质含量减少，有一蛋白带缺如，说明细胞合成蛋白质的功能受到了损害。

Cooksey（1968）认为，完整的苏云金杆菌晶体无毒性，它的作用与昆虫肠道的碱性 pH 和蛋白酶有密切关系，晶体在肠道中被蛋白酶水解释放出具有毒性的碎片。沙槎云等(1982)也证实昆虫肠道的蛋白酶对多种苏云金杆菌晶体有消化作用。但是，晶体在肠道消化的过程中，对蛋白酶活性有何影响，则未见有报道，我们测定了经 *B. t. i.* 处理之后 10 分钟和 1 小时的蚊幼虫中肠的蛋白酶活性，发现酶活性有下降现象，而且时间愈长下降愈明显；我们分析，*B. t. i.* 晶体在蚊幼虫肠道被消化的作用，可能主要是碱性 pH 肠液的溶解作用，这会使肠道的 pH 发生改变，从而影响蛋白酶的活性，加上幼虫拒食后饥饿的影响，将共同促使中肠蛋白酶活性的明显下降。

因此，根据研究结果和讨论分析，我们初步认为，*B. t. i.* 对蚊幼虫的毒杀作用是 *B. t. i.* 晶体的毒素抑制中肠上皮细胞能量代谢的同时影响中肠的蛋白酶活性，从而加速幼虫的死亡。

参　考　文　献

沙槎云等 1982 昆虫肠道蛋白酶对苏芸金杆菌晶体作用的比较　昆虫学报 **25**(3)：244—49。

Barjac, H. de 1978c. Etude cytologique de laction de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* sur larves de moustiques. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris Ser. D.* **286**: 1629—32.

Cooksey, K. E. 1968 Purification of protein from *B. thuringiensis* toxin to larvae of Lepidoptera. *Biochem. J.* **106**. 445—54.

Cooksey, K. E. et al., 1969. Nerve-blocking effect of *B. thuringiensis* protein toxin. *J. Invert. Pathol.* **13**: 461—2.

Fast, P. G. et al., 1971 The δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. II. On the mode of action *J. Invert. Pathol.* **18**(1): 135—8.

Hackenbrack, C. R. 1966 Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria I. Reversible ultrastructural changes. with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **30**: 269—97.

Lüthy, P. 1973 Self-digestion of the gut epithelium: A possible explanation for the mode of action of the endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **22**: 139—40.

Paul, G. F. 1974 The δ-endotoxin of *B. thuringiensis* V. On the occurrence of endotoxin fragments in hemolymph. *J. Invert. Pathol.* **23**(3). 280—4.

Travers, R. S. et al., 1976 *Effect of Bacillus thuringiensis var. kurstaki* δ-endotoxin on isolated Lepidoptera mitochondria *J. Invert. Pathol.* **28**(3): 351—6.

A PATHOLOGICAL STUDY ON MOSQUITO LARVAE TREATED WITH *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS*

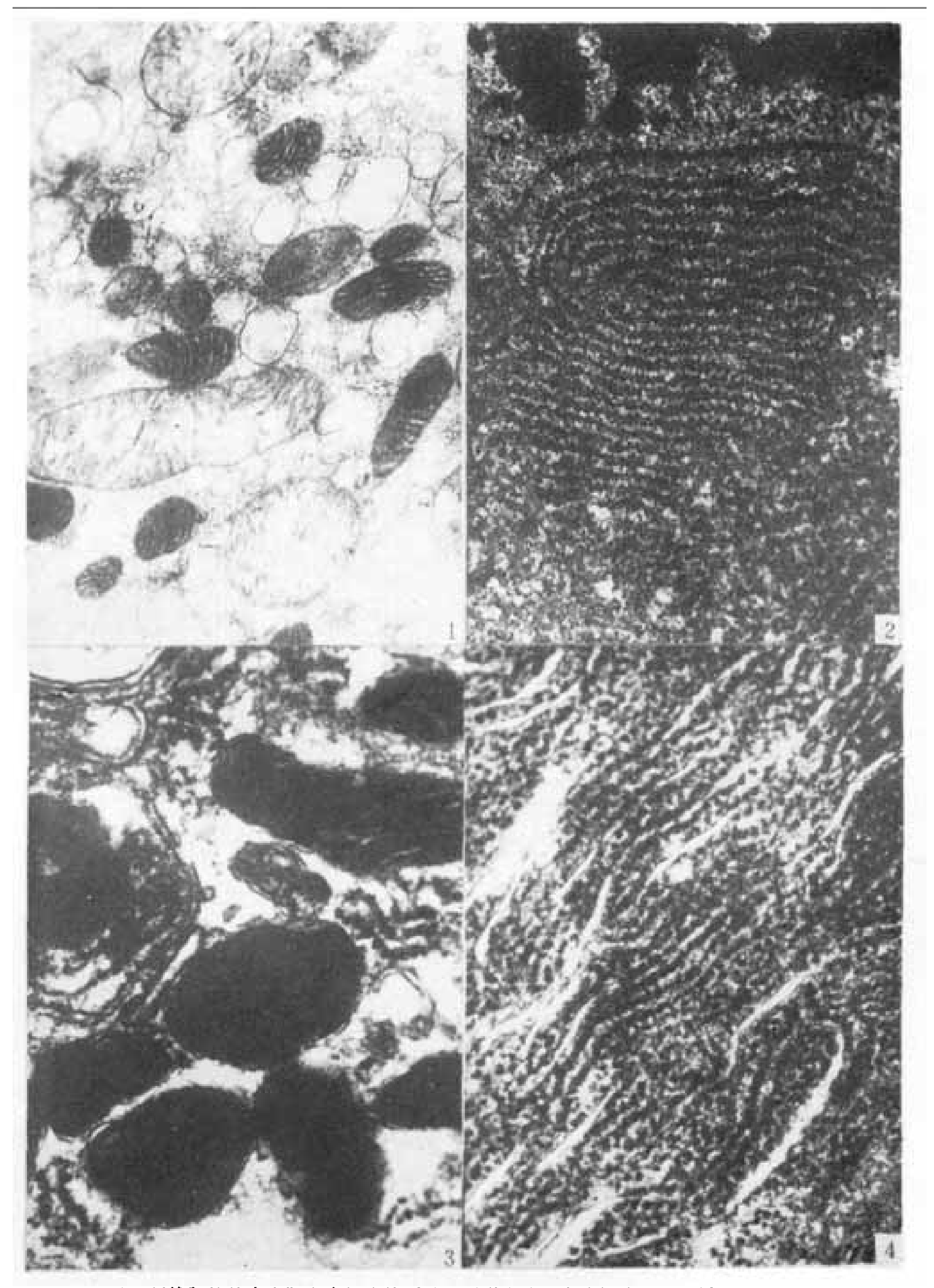
WU TSIU-YAN

(Institute of Entomology, Zhong-shan University)

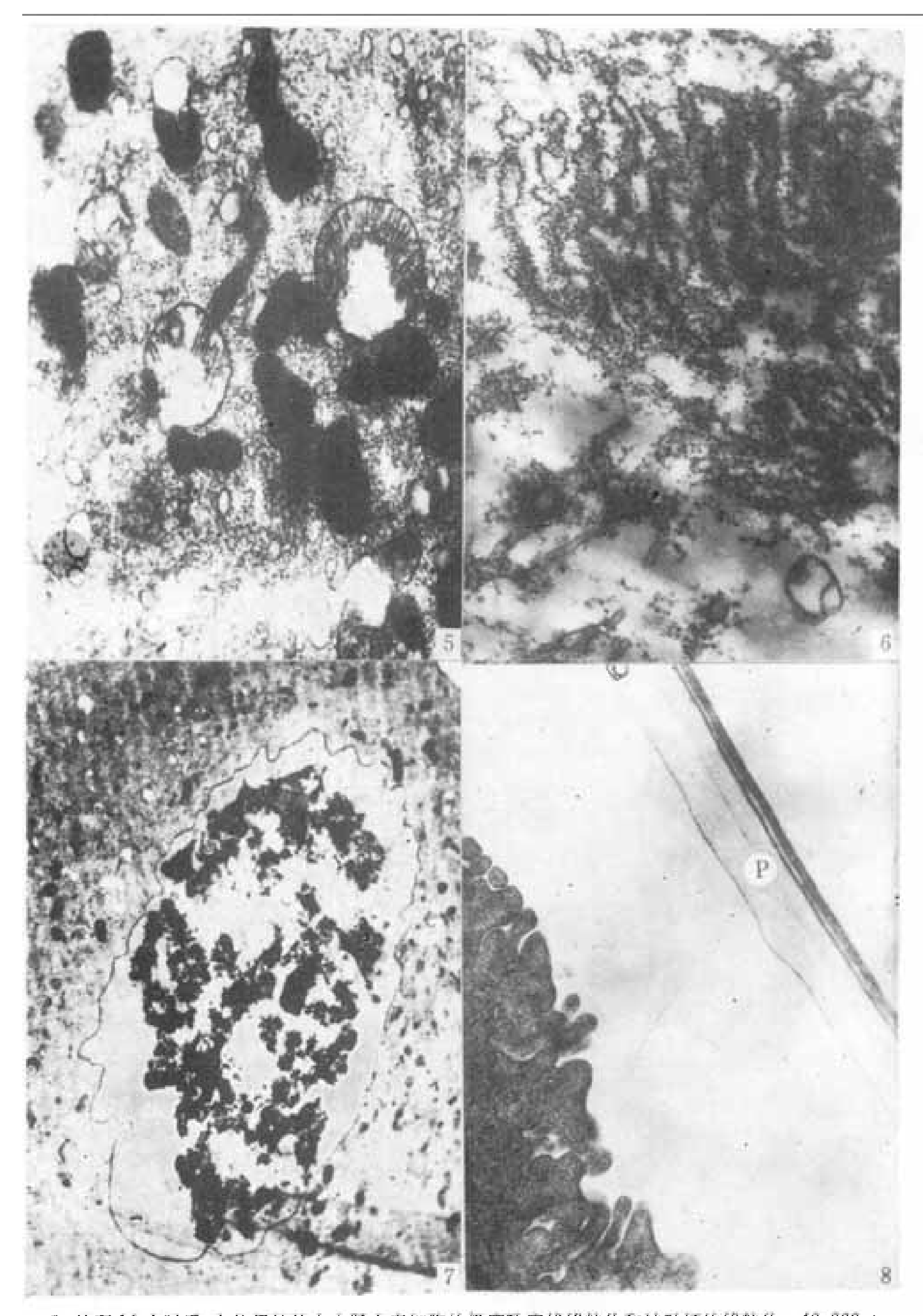
This paper deals with the pathological changes of the larvae of *Aedes albopictus* Skuse, *Armigeres subalbatus* Walker and *Culex fatigens* Wiedemann treated with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*B. t. i.*). It was observed that at ten minutes after the larvae were treated with *B. t. i.* pathological changes began to appear in the midguts. Observation under electron microscope showed that the mitochondria of the midgut epithelial cells became "condensed", with the intracristal spaces irregularly enlarged and the matrix highly electron dense. Most of the endoplasmic reticula lost ribosomes and their boundary lines bacame blurred. At 16 hours after the treatment the nuclei of the epithelial cells swelled and vacuoles appeared in the cytoplasm. However, the peritrophic membrane at this stage still remained intact. Biochemical analysis with *Ar. subalbatus* showed that the saline soluble proteins of the midgut decreased in amount and one of the protein bands in the electrophoregram was lost. It was also revealed that in the larvae at ten minutes after being treated with *B. t. i.* the proteinase activity of the midgut decline although the proteinase activities were different in the different mosquito species and mainly trypsin-like.

The results of this work indicate that the toxin (toxins) of *B. t. i.* affects the energy metabolism and proteinase activity of the midgut epithelial cells of the mosquito larvae.

Key words *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*——mosquito larvae——pathological change



1　骚扰阿蚊幼虫中肠上皮细胞的两种不同形态的正常线粒体。40,000×
2　骚扰阿蚊幼虫中肠上皮细胞的正常的粗糙内质网。50,000×
3　处理 10 分钟后，骚扰阿蚊幼虫中肠上皮细胞的极度致密状线粒体。100,000×
4　处理 10 分钟后，骚扰阿蚊幼虫中肠上皮细胞被瓦解的粗糙内质网。100,000×



5 处理16小时后，白纹伊蚊幼虫中肠上皮细胞的极度致密状线粒体和被破坏的线粒体。40,000×
6 处理16小时后，致乏库蚊幼虫中肠上皮细胞断裂了的粗糙内质网。40,000×
7 处理16小时后，白纹伊蚊幼虫中肠上皮细胞的膨胀了的细胞核。5,000×
8 处理16小时后，白纹伊蚊幼虫中肠上皮的微绒毛萎缩而围食膜（P）完正。20,000×